

## 硫酸化糖鎖と炎症

小林基弘<sup>\*1</sup> 内村健治<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> 信州大学大学院医学系研究科分子病理学講座

<sup>\*2</sup> 名古屋大学大学院医学研究科生化学第一講座

### はじめに

リンパ節、扁桃、パイエル板といった二次性リンパ性器官に定住するリンパ球は、輸出リンパ管から胸管を経て左鎖骨下静脈に入る。こうして血管系に入ったリンパ球は、二次性リンパ性器官に存在する特殊な血管を介して再び二次性リンパ性器官に戻る。この現象は、北太平洋で大きく育ったサケが産卵のために自分の生まれた川に帰巢(ホーミング)するのに似ていることから、リンパ球ホーミングといわれる。一日数十回も繰り返されているこのホーミング機構により、リンパ球は抗原提示細胞の集まる二次性リンパ性器官に幾度も帰巢することで、自らに定められた抗原と出会う可能性を高めているのである。

リンパ球ホーミングは多段階の分子シグナルによって精密に制御されている<sup>1)</sup>(図 1)。まず初めに、血管内を高速(約 4,000  $\mu\text{m}/\text{秒}$ )で流れているリンパ球は、その表面に恒常的に発現しているカルシウム依存性糖鎖結合タンパク質である L-セ렉チンと、二次性リンパ性器官に存在する高内皮細静脈 high endothelial venule (HEV)という特殊な血管の内腔面に発現する硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との比較的弱い結合反応によって、HEV 内腔面に接触しながら転がり(ローリング)、その速度を 10~50  $\mu\text{m}/\text{秒}$ まで落とす。これは高速道路を時速 100 km で走行していた自動車が、インターチェンジの側道に入り、時速 30 km まで速度を落とすのに例えられよう。次にケモカインの作用により活性化されたリンパ球表面のインテグリンが ICAM-1, VCAM-1, MAAdCAM-1 といった HEV 内腔面に発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属するリガンドと強固に結合することで、リンパ球は HEV 内腔面に接着する。これはインターチェンジの側道を時速 30 km で走行していた自動車が料金所で停止するのに例えられよう。そして最後に、リンパ球は血管内皮細胞の間隙から血管外のリンパ組織実質に遊走する。これは料金所を通過した自動車が一般道に出て行くのに例えられよう。このリンパ球ホーミング機構は二次性リンパ性器官における生理的なリンパ球ホーミングのみならず、慢性炎症巣におけるリンパ球浸潤においても用いられている。

本稿では、L-セ렉チンリガンドである硫酸化シアリルルイス X 糖鎖ならびにその生合成に関与する糖転移酵素、硫酸転移酵素の基礎事項について概説した後、この硫酸化糖鎖による慢性炎

症巣におけるリンパ球浸潤の制御機構を、我々の研究成果を中心に解説する。

## I. L-セレクトリンリガンド糖鎖の構造

HEV は腫大した核を有する丈の高い内皮細胞で構成された特殊な細静脈で、単クローン抗体 MECA-79 で特異的に染色される(図 2)。HEV を構成する内皮細胞の血管内腔面には、CD34, Podocalyxin, Endomucin, Nepmucin, MAdCAM-1 といったシアロムチン糖タンパク質が発現しており、これらのタンパク質の O-結合型糖鎖修飾部位に結合している糖鎖には、コア 1 伸長鎖およびコア 2 分岐鎖双方のキャッピング構造として、N-アセチルラクトサミン(Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc)にシアル酸、フコース、硫酸基が付加された硫酸化シアリルルイス X 糖鎖とよばれる糖鎖構造が存在する(図 3)。コア 1 伸長鎖上の硫酸化シアリルルイス X 糖鎖は、前述の MECA-79 抗体のエピトープと重なっている。これら O-結合型糖鎖のコア 1 伸長鎖上、コア 2 分岐鎖上の硫酸化シアリルルイス X 糖鎖に加え、N-結合型糖鎖上の硫酸化シアリルルイス X 糖鎖も、L-セレクトリンリガンドとして機能することが示されている<sup>3)</sup>。

## II. L-セレクトリンリガンド糖鎖の生合成に関わる酵素

### 1. コア 1-N-アセチルグルコサミン転移酵素(Core1- $\beta$ 3GlcNAcT)

O-結合型糖鎖のコア 1 構造に $\beta$ 1,3 結合で N-アセチルグルコサミンを転移し、コア 1 構造を伸長させる酵素は Core1- $\beta$ 3GlcNAcT である<sup>4)</sup>。この酵素遺伝子のノックアウトマウスでは MECA-79 抗原が消失することから、この酵素はコア 1 伸長に関わる唯一の酵素であると推測される<sup>3)</sup>。

### 2. コア 2-N-アセチルグルコサミン転移酵素(Core2GlcNAcT)

O-結合型糖鎖のコア 1 構造に $\beta$ 1,6 結合で N-アセチルグルコサミンを転移し、コア 2 分岐構造をつくる Core2GlcNAcT は現在までに 3 種類が報告されているが<sup>4)</sup>、Core2GlcNAcT-I が HEV の内皮細胞に発現し、L-セレクトリンリガンド糖鎖の生合成に関わることが明らかにされている<sup>5)</sup>。Core2GlcNAcT-I 遺伝子欠損マウスでは、リンパ節に発現する GlyCAM-1 のコア 2 分岐構造がほぼ消失する<sup>5)</sup>。

### 3. フコース転移酵素(FucT)

硫酸化シアリルルイス X 構造内の N-アセチルグルコサミン残基に $\alpha$ 1,3 結合でフコースを転移する酵素は FucT-IV および FucT-VII である。FucT-VII 遺伝子欠損マウスではリンパ節へのリンパ球ホーミングがほぼ消失するため<sup>6)</sup>、HEV では FucT-VII が主に L-セレクトリンリガンド糖鎖の生合成に働いていると考えられる<sup>7)</sup>。

### 4. シアル酸転移酵素(ST3Gal)

ガラクトース残基に $\alpha$ 2,3 結合でシアル酸を転移する酵素は 6 種類が報告されている。酵素基質特異性から ST3Gal-IV と ST3Gal-VI が HEV において L-セレクトリンリガンド糖鎖の生合成に関与しており、それらの作用は一部相補し合っていることが明らかになっている<sup>8,9)</sup>。

### 5. *N*-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST)

硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の *N*-アセチルグルコサミンの 6 位の硫酸化は GlcNAc6ST により担われている。ヒトでは 5 種類の GlcNAc6ST が存在する<sup>10)</sup>。GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 は HEV の内皮細胞に発現し L-セレクトリンリガンド合成能を有することが確認されている<sup>5,11,12)</sup>。基質特異性<sup>13)</sup>、ゴルジ装置内での局在<sup>14,15)</sup>、および遺伝子欠損マウスの HEV での MECA-79 抗体染色パターンの違いから<sup>11,12)</sup>、GlcNAc6ST-1 はコア 2 分岐鎖上の、GlcNAc6ST-2 はコア 1 伸長鎖およびコア 2 分岐鎖上の *N*-アセチルグルコサミンの硫酸化を担っていることが示唆される。GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 の両遺伝子欠損マウスでは、末梢リンパ節へのホーミングが T, B 両リンパ球ともに減少する<sup>16)</sup>。また生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いた解析より、このマウスの HEV ではリンパ球のローリングは起こるがリンパ球の減速が不完全であり、次の作用段階であるケモカイン刺激を受け取れず、HEV での接着不全が起こると推測される。

## III. 慢性活動性胃炎

*Helicobacter pylori* は胃に生息するグラム陰性微好気性螺旋状桿菌で、世界人口の半数以上に感染しており、その感染は時に慢性活動性胃炎を引き起こす<sup>17)</sup>。病理組織学的には、慢性活動性胃炎では粘膜固有層主体のリンパ球浸潤を呈し、最終的には胃粘膜上皮の腸上皮化生と固有胃腺の萎縮に至る。我々は胃生検の組織標本を観察した際、粘膜固有層のリンパ球浸潤巣に HEV 様血管がしばしば出現していることに着目し、慢性活動性胃炎では二次性リンパ性器官におけるリンパ球ホーミングと同様、L-セレクトリンと硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との結合を介してリンパ球浸潤が惹起されるのではないかと考えた。そこで慢性活動性胃炎の組織切片を用いて免疫組織化学的解析を行った結果、胃粘膜固有層に出現する HEV 様血管は L-セレクトリンリガンド糖鎖を認識する MECA-79, HECA-452, および NCC-ST-439 抗体で特異的に染色された<sup>18)</sup>。L-セレクトリン・IgM キメラ分子がカルシウム依存的にこれらの HEV 様血管に結合したことから、慢性活動性胃炎におけるリンパ球浸潤は二次性リンパ性器官同様、L-セレクトリンと硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との結合を介して行われていると考えられた。また慢性活動性胃炎 143 例を解析した結果、MECA-79 および HECA-452 陽性 HEV 様血管の出現頻度は、updated Sydney system で評価した単核細胞浸潤の程度に応じて増加していた(図 4)。さらに *H. pylori* の除菌後にはこれらの HEV 様血管は消失し、それに伴ってリンパ球浸潤が沈静化していたことから(図 5)。

lipopolisaccharide などの *H. pylori* の菌体成分が、胃粘膜上皮細胞の Toll-like receptor を介して lymphotoxin  $\alpha$  などのサイトカイン産生を促し、細静脈を形態学的、機能的に HEV 様血管に転換させている可能性が考えられた。

#### IV. 潰瘍性大腸炎

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜を侵す原因不明の慢性炎症性疾患であり、何らかの自己免疫機序を背景とした腸管細菌叢に対する異常な炎症反応と考えられている。病理組織学的には、潰瘍性大腸炎は陰窩膿瘍に加えて、粘膜固有層に basal plasmacytosis とよばれるびまん性のリンパ球・形質細胞浸潤が認められる。生理的状态においては、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンを発現した感作 T リンパ球が、腸管粘膜のパイエル板や粘膜固有層に存在する細静脈の内腔面に発現している mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) との結合を介して腸管粘膜に浸潤し、所謂「生理的炎症」を示す。一方、活動期潰瘍性大腸炎では慢性活動性胃炎と同様、粘膜固有層のリンパ球浸潤巣に HEV 様血管がしばしば認められることから、潰瘍性大腸炎においても L-セレクトリンと硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との結合がリンパ球浸潤に関与していると考えられた。そこで潰瘍性大腸炎 44 例の組織切片を用いて免疫組織化学的解析を行った結果、活動期潰瘍性大腸炎の粘膜固有層に出現する HEV 様血管は、MECA-79 および HECA-452 両抗体で染色され (図 6A)、とりわけ MECA-79 陽性 HEV 様血管の出現頻度は、ulcerative colitis disease activity index (UCDAI) で評価した寛解期症例に比して、活動期症例で有意に高かった<sup>19)</sup> (図 6B)。また慢性活動性胃炎同様、L-セレクトリン・IgM キメラ分子が組織切片上でこれら HEV 様血管にカルシウム依存的に結合したことから、活動期潰瘍性大腸炎におけるリンパ球浸潤も L-セレクトリンと硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の結合により惹起されていると考えられた。次に、この硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関与する硫酸転移酵素を明らかにするため、パラフィン包埋組織から RNA を抽出し、RT-PCR による遺伝子発現解析を行ったところ、GlcNAc6ST-1 の発現が潰瘍性大腸炎の活動期で選択的に認められたことから、活動期潰瘍性大腸炎における L-セレクトリンリガンド糖鎖の硫酸化は GlcNAc6ST-1 が担っていることが示唆された<sup>19,20)</sup>。このことは、腸管粘膜パイエル板の硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現が GlcNAc6ST-2 遺伝子欠損マウスでは保たれる一方、GlcNAc6ST-1 遺伝子欠損マウスでは消失することからも支持された<sup>16)</sup> (図 7)。

#### おわりに

硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現した HEV 様血管は、本稿で述べた慢性活動性胃炎、潰瘍性大腸炎の他、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、自己免疫性膵炎<sup>21)</sup>などの慢性炎症性疾患はもと

より、胃悪性リンパ腫<sup>22)</sup>や唾液腺ワルチン腫瘍<sup>23)</sup>といった腫瘍性病変にも認められており、L-セレクチンと硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との相互作用が様々な疾患の病態形成に関与している可能性が強く示唆される。今後のさらなる糖鎖研究の発展により得られた成果が、慢性炎症性疾患の病態解明のみならず、種々の疾患の理解や新たな治療法開発に繋がることを期待する。

## 文献

- 1) Butcher, E. C., Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996, **272**: 60–66
- 2) Kobayashi, M., Hoshino, H., Suzawa, K. et al.: Two distinct lymphocyte homing systems involved in the pathogenesis of chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Semin Immunopathol* 2012, **34**: 401–413
- 3) Mitoma, J., Bao, X., Petryniak, B. et al.: Critical function of *N*-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat Immunol* 2007, **8**: 409–418
- 4) Yeh, J. C., Hiraoka, N., Petryniak, B. et al.: Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a core 1 extension  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* 2001, **105**: 957–969
- 5) Hiraoka, N., Kawashima, H., Petryniak, B. et al.: Core 2 branching  $\beta$ 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase and high endothelial venule-restricted sulfotransferase collaboratively control lymphocyte homing. *J Biol Chem* 2004, **279**: 3058–3067
- 6) Malý, P., Thall, A., Petryniak, B. et al.: The  $\alpha$ (1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 1996, **86**: 643–653
- 7) Homeister, J. W., Thall, A. D., Petryniak, B. et al.: The  $\alpha$ (1,3)fucosyltransferase FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing. *Immunity* 2001, **15**: 115–126
- 8) Sperandio, M.: Selectins and glycosyltransferase in leukocyte rolling *in vivo*. *FEBS J* 2006, **273**: 4377–4389
- 9) Yang, W. H., Nussbaum, C., Grewal, P. K. et al.: Coordinated roles of ST3Gal-VI and ST3Gal-IV sialyltransferases in the synthesis of selectin ligands. *Blood* 2012, **120**: 1015–1026
- 10) Uchimura, K., Rosen, S. D.: Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic

inflammation. Trends Immunol 2006, **27**: 559–565

- 11) Hemmerich, S., Bistrup, A., Singer, M. S. et al.: Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. Immunity 2001, **15**: 237–247
- 12) Uchimura, K., Kadomatsu, K., El-Fasakhany, F. M. et al.: *N*-acetylglucosamine 6-*O*-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. J Biol Chem 2004, **279**: 35001–35008
- 13) Uchimura, K., El-Fasakhany, F. M., Hori, M. et al.: Specificities of *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. J Biol Chem 2002, **277**: 3979–3984
- 14) de Graffenried, C. L., Bertozzi, C. R.: Golgi localization of carbohydrate sulfotransferase is a determinant of L-selectin ligand biosynthesis. J Biol Chem 2003, **278**: 40282–40295.
- 15) Fujiwara, M., Kobayashi, M., Hoshino, H. et al.: Expression of long-form *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase 1 in human high endothelial venules. J Histochem Cytochem 2012, **60**: 397–407
- 16) Uchimura, K., Gauguier, J. M., Singer, M. S. et al.: A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. Nat Immunol 2005, **6**: 1105–1113
- 17) Kobayashi, M., Lee, H., Nakayama, J. et al.: Roles of gastric mucin-type *O*-glycans in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Glycobiology 2009, **19**: 453–461
- 18) Kobayashi, M., Mitoma, J., Nakamura, N. et al.: Induction of peripheral lymph node addressin in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, **101**: 17807–17012
- 19) Suzawa, K., Kobayashi, M., Sakai, Y. et al.: Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. Am J Gastroenterol 2007, **102**: 1499–1509
- 20) Kobayashi, M., Hoshino, H., Masumoto, J. et al.: GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2009, **15**: 697–706
- 21) Maruyama, M., Kobayashi, M., Sakai, Y. et al.: Periductal induction of high endothelial venule-like vessels in type 1 autoimmune pancreatitis. Pancreas 2013, **42**: 53–59



- 22) Kobayashi, M., Mitoma, J., Hoshino, H. et al.: Prominent expression of sialyl Lewis X-capped core 2-branched O-glycans on high endothelial venule-like vessels in gastric MALT lymphoma. J Pathol 2011, **224**: 67-77
- 23) Ohya, A., Kobayashi, M., Sakai, Y. et al.: Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumour. Pathology 2013, **45**: 150-154

## 凡例

**図 1 リンパ球ホーミングの多段階モデル** リンパ球表面に発現する L-セレクトリンと HEV 内腔面に発現する peripheral lymph node addressin (PNAd)とよばれる糖タンパク質上の硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との分子間相互作用は、リンパ球ホーミングの第一段階であるローリングに重要である。

**図 2 HEV の顕微鏡写真** a) HEV は腫大した核を有する丈の高い内皮細胞から構成された特殊な細静脈である。b) HEV は MECA-79 抗体で特異的に染色される。

**図 3 L-セレクトリンリガンドの糖鎖構造** 硫酸化シアリルルイス X はコア 1 伸長鎖あるいはコア 2 分岐鎖のいずれの上にも存在しても L-セレクトリンリガンドとして機能する。HECA-452 抗原(シアリルルイス X), MECA-79 抗原(硫酸化 N-アセチルラクタミン), NCC-ST-439 抗原(コア 2 分岐鎖上のシアリルルイス X)をそれぞれピンク, 紫, 緑の四角で示す。SA:シアル酸, Fuc:フコース, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>:硫酸基, Gal:ガラクトース, GlcNAc:N-アセチルグルコサミン, GalNAc:N-アセチルガラクトサミン。文献 2 より許可を得て引用。

**図 4 慢性活動性胃炎における HEV 様血管の誘導** A) 高度の慢性炎症(下段)では、粘膜固有層に MECA-79 および HECA-452 陽性 HEV 様血管が認められ、周囲にはリンパ球が密に浸潤している。軽度の慢性炎症(上段)ではこれらの HEV 様血管は認められない。B) MECA-79 ないし HECA-452 陽性 HEV 様血管の出現頻度は単核細胞浸潤の程度に応じて増加している。C) MECA-79 ないし HECA-452 陽性 HEV 脈様血管の出現頻度が 1%以上の患者の頻度は慢性炎症の程度に応じて増加している。文献 18 より許可を得て引用。Copyright 2004 National Academy of Science, U.S.A.

**図 5 *Helicobacter pylori* の除菌による HEV 様血管の消失** MECA-79 および HECA-452 陽性

HEV 様血管(上段)は, *H. pylori* の除菌によって完全に消失している(下段). 文献 18 より許可を得て引用. Copyright 2004 National Academy of Science, U.S.A.

**図 6 活動期潰瘍性大腸炎における HEV 様血管の誘導** A) 活動期(左)では MECA-79 および HECA-452 陽性 HEV 様血管が認められ, 周囲には密なリンパ球浸潤が認められるが, 寛解期(右)ではこれらの HEV 様血管は認められない. B) 活動期における MECA-79 陽性 HEV 様血管の出現頻度は, 寛解期に比して有意に増加している. 文献 19 より許可を得て引用.

**図 7 GlcNAc6ST 遺伝子欠損マウスの HEV における硫酸化シアリルルイス X の発現** GlcNAc6ST-1 遺伝子欠損マウスのパイエル板では, 硫酸化シアリルルイス X の発現が消失している. WT:野生型, GlcNAc6ST-1 KO:GlcNAc6ST-1 遺伝子欠損マウス, GlcNAc6ST-2 KO:GlcNAc6ST-2 遺伝子欠損マウス, DKO:GlcNAc6ST-1, GlcNAc6ST-2 両遺伝子欠損マウス, PLN:末梢リンパ節, MLN:腸間膜リンパ節, PP:パイエル板. 文献 16 より許可を得て引用.